

機関番号：36102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20500296

研究課題名 (和文) 抑制性シナプス可塑性を制御する分子機構の解明

研究課題名 (英文) Regulation mechanism of inhibitory synaptic plasticity

研究代表者

栗生 俊彦 (Kuriu Toshihiko)

徳島文理大学 香川薬学部 助教

研究者番号：10401374

研究成果の概要 (和文)：

抑制性シナプスの動態を可視化するために、抑制性シナプス前部および後部を蛍光蛋白質を用いて標識した。形成された抑制性シナプス前・後部は、顕著な形態変化を示し、培養日数に依存して安定化された。シナプス形態の安定化が急速に進む時期とシナプス密度が上昇する時期はよく一致しており、その時期に特徴的な形態変化 (シナプスの融合、分裂、移動) が観察された。シナプス形成が活発な時期に、抑制性シナプスは、顕著な形態変化をしながら、その配置や密度を調節していると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

To visualize dynamics of both presynaptic and postsynaptic structures on inhibitory synapse, we used two distinct pre- and postsynaptic fluorescent probes. Venus-expressing presynaptic inhibitory varicosities markedly change their morphology and the postsynaptic clusters of mCherry-gephyrin dynamically move around inhibitory synaptic sites. These movements of inhibitory synaptic contact sites stabilized depending on the length of culture period. The motilities of preaxonal varicosities and postsynaptic gephyrin clusters significantly decreased during the period of the maximum increases in their densities. They underwent characteristic long-lasting changes (fusion, fission, movement) in their shape during synaptogenesis. These results suggest that motilities of pre- and postsynaptic structure could play an important role in the inhibitory synapse formation, including rearrangements during synaptogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：抑制性シナプス・シナプス可塑性・シナプス形成

1. 研究開始当初の背景

脳内神経細胞のシナプスにおいて、神経活動（経験）に依存してシナプス伝達効率が長期的に変化するシナプス可塑性現象が普遍的に誘発される。このシナプス可塑性現象は、脳の高次機能を達成するための重要な基礎過程として注目されている。シナプス可塑性に関する研究は、これまで特に哺乳類の海馬興奮性シナプスにおける長期増強（long-term potentiation; LTP）および長期抑圧（long-term depression; LTD）の誘発維持機構の解明に集中している。一方、抑制性シナプスにおいても、LTPやLTDが起こることが知られているが、興奮性シナプスに比較して研究が立ち遅れており、抑制性シナプス可塑性の分子機構の実態は、ほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究計画では、抑制性シナプス部位へのGABA_A受容体配送過程を支配しているシナプス機能分子の動態、およびその制御機構を単一シナプスレベルで解析することによって、抑制性GABAシナプス可塑性を引き起こす分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

研究の目的を達成するために、最初に抑制性シナプス前部および後部を可視化し、コンフォーカル顕微鏡下で生きた細胞上で可視化された抑制性シナプスの動態を追跡する系の確立を行った。抑制性シナプスの可視化は、抑制性シナプス前部および後部を蛍光蛋白質を用いて標識することによって実現した。Vesicular GABA transporter (VGAT)- Venus トランスジェニック・マウスの海馬神経細胞を分散培養すると、Venus 蛍光シグナルは抑制性神経細胞に特異的に発現しており、その軸索および varicosity にも蛍光が認められ、抑制性シナプス前部の形態を可視化することができた。一方、抑制性シナプス後部の足場蛋白質である gephyrin に蛍光蛋白質 mCherry をつないだ遺伝子をアデノウイルスにより培養海馬ニューロンに導入発現させると、抑制性シナプス後部に局在した mCherry-gephyrin 分子の集積が見られた。遺伝子改変マウスを用いた抑制性シナプス前部 varicosity の標識と mCherry-gephyrin による抑制性シナプス後部の標識を組み合わせることにより、抑制性シナプス前部および後部を同時に可視化することが可能となった（図1）。

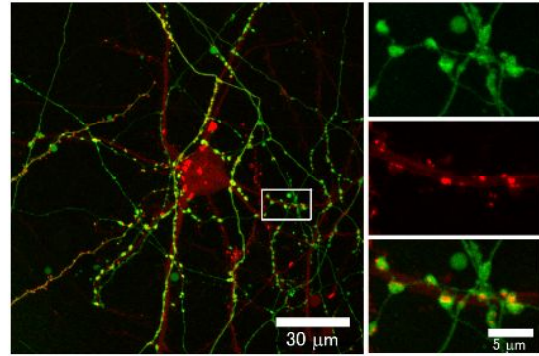


図1. 可視化された抑制性シナプス。黄色蛍光蛋白質 Venus によりシナプス前部(緑)を、赤色蛍光蛋白質と gephyrin の融合蛋白質 (mCherry-gephyrin) によりシナプス後部(赤)を、それぞれ可視化した。

4. 研究成果

(1) 抑制性シナプスの可視化

VGAT-Venus トランスジェニック・マウスを用いた分散培養下で観察された抑制性神経細胞には、Venus が発現しており、抑制性神経細胞を起始とする軸索の形態が観察できた。軸索に沿って形成された膨らみ (varicosity) が観察され、抑制性シナプス前部のマーカーである GAD で免疫染色したところ、varicosity と GAD 染色パターンはよく一致していた。この結果は、Venus によって可視化された varicosity が抑制性シナプス前部であることを示唆している。

一方、抑制性シナプス後部を可視化するために mCherry-gephyrin をアデノウイルスを用いて遺伝子導入すると、樹状突起内に mCherry-gephyrin はクラスターを形成した。GAD の免疫染色パターンと比較すると、GAD と接した位置に mCherry-gephyrin のクラスターが形成されていた。GABA 受容体サブユニットである GABA_A gamma2 サブユニットを免疫染色パターンと mCherry-gephyrin のクラスターを比較すると 90%以上が共局在していた。さらに内在性 gephyrin の免疫染色パターンとは、ほぼ完全に一致した。これらの結果は、mCherry-gephyrin cluster が抑制性シナプス後部に局在していることを示している。Venus 蛍光により抑制性シナプス前部、mCherry-gephyrin により抑制性シナプス後部をそれぞれ可視化して、コンフォーカル顕微鏡下で観察すると、varicosity と mCherry-gephyrin クラスターが接していることが確認できた（図1）。これらの結果は、

varicosity と mCherry-gephyrin の接触部位が抑制性シナプスを形成していることを強く示唆している。

(2) 抑制性シナプスにおける発生依存的な形態変化

①シナプスの密度とサイズ

Venus 蛍光により抑制性シナプス前部、mCherry-gephyrin により抑制性シナプス後部をそれぞれ可視化して、コンフォーカル顕微鏡下で抑制性シナプスの形態を観察したところ、培養日数に依存して、抑制性シナプス密度が増加することが分かった。しかしながら、varicosity や gephyrin のサイズには変化がなかった。それぞれの培養日数で電気生理学的測定法を用いて、微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) を測定したところ、培養日数に依存した抑制性シナプス密度の増加に同期して mIPSC の頻度と振幅の増大が見られた。

②time-lapse imaging

次に培養の各ステージで time-lapse imaging を行ったところ、培養初期 (9-11DIV) では、形成された抑制性シナプス前部・後部が顕著な形態変化していることが明らかになった (図 2)。培養後期 (16-25DIV) ではこれらの形態変化は安定化された。

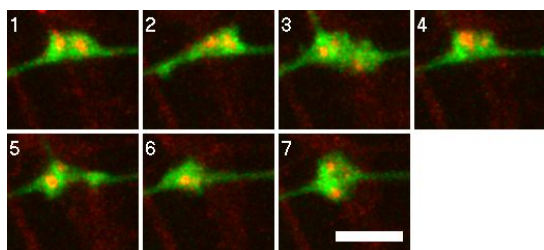


図 2. 抑制性シナプスの time-lapse imaging. 20 分毎に画像を取得した。単一抑制性シナプスの前部 varicosity (緑) は顕著に形態変化し、後部 mCherry-gephyrin クラスタ (赤) は、大きくその局在を変化させた。スケールバー : 3 μm .

シナプス形態の安定化が急速に進む時期とシナプス密度が上昇する時期はよく一致しており、その時期 (12-14DIV) に長時間の time-lapse imaging を行ったところ、特徴的な形態変化 (シナプスの融合、分裂、移動) が観察された (図 3)。これらの結果は、培養初期からシナプス形成が活発な時期にかけて、抑制性シナプスは顕著な形態変化をしながら、融合・分裂・移動を繰り返して、その配置や密度を調節することを示唆してい

る。

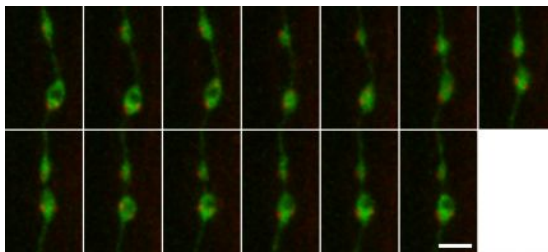


図 3. 抑制性シナプスの time-lapse imaging. 1 時間毎に画像を取得した。画像上には 2 個の抑制性シナプスが見られるが、時間経過とともに移動によって 2 個のシナプス間の距離が小さくなった。スケールバー : 2 μm .

(3) 抑制性シナプスにおける形態変化の神経活動依存的な調節

培養初期に見られる抑制性シナプスの大きな形態変化は、培養後期 (16-25 DIV) では安定化される。しかしながら、安定化された培養後期においても、微小な形態変化は起きている。また、培養初期では、活動電位の発生はほとんど見られないが、16 DIV 以降では、興奮性神経細胞、抑制性神経細胞ともに、活動電位を引き起こすことが分かった。そこで、培養後期に見られる活動電位と微小な形態変化との関係について調べた。

培養後期に長期間の TTX 処理を行うと、homeostatic plasticity と呼ばれる、シナプス強度の変化が起こることが知られている。2 日間の TTX 処理によって、興奮性シナプスにおいては、シナプス電流の増強が引き起こされ、抑制性シナプスにおいては、シナプス電流の減少が引き起こされる。そこで、培養海馬神経細胞を 2 日間 TTX 存在下で培養したところ、抑制性シナプス電流の減少を再現することができた。同様に TTX 処理をした時の抑制性シナプスの形態とその変化について、未処理の培養海馬神経細胞と比較した。TTX 処理により抑制性シナプス前部 varicosity のサイズは減少したが、抑制性シナプス後部の gephyrin クラスタのサイズには変化がなかった。培養後期に見られる微小な形態変化については、TTX 処理によりシナプス前部 varicosity の動態には影響しなかったが、シナプス後部の gephyrin クラスタの動きの安定化が引き起こされた。

2 日間の TTX 処理によって引き起こされたシナプス前部 varicosity のサイズ減少とシナプス後部 gephyrin cluster の安定化が、結果として抑制性シナプス電流の減少を引き起こしていると考えられる。これらの結果は、抑制性シナプスにおける形態変化はシナプス電流の振幅とともに神経活動依存

的に調節されることを示唆している。

以上の結果についてまとめた論文は、現在投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Nakazawa T., Kuriu T., Tezuka T., Umemori H., Okabe S., Yamamoto T. Regulation of dendritic spine morphology by an NMDA receptor-associated RhoGTPase activating protein, p250GAP. *J. Neurochem.* 105: 1384-1393 (2008) (査読有)

[学会発表] (計5件)

1. Kuriu T., Yanagawa Y., Konishi S.
題名: Formation and dynamics of GABAergic inhibitory synaptic connections between hippocampal interneurons and pyramidal neurons.
学会名: 2010 Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience, 2010.
場所: San Diego 年月: 2010年11月16日

2. 申 義庚、栗生俊彦、岡部繁男
題名: Doublecortin-like kinase による神経細胞の樹状突起形態・シナプス機能の統合的調節
学会名: Neuro2010 (第33回神経科学大会、第53回日本神経化学学会大会、第20回日本神経回路学会大会、合同大会)
場所: 神戸 年月: 2010年9月2日

3. 栗生俊彦、柳川右千夫、小西史朗
題名: Simultaneous imaging of the motility of presynaptic varicosities and postsynaptic scaffolding proteins at inhibitory synapses.
学会名: 第36回国際生理学会 (IUPS2009)
場所: 京都 年月: 2009年7月28日

4. 中澤敬信、栗生俊彦、岡部繁男、山本雅
題名: p250GAP, a brain-enriched RhoGAP, is involved in the NMDA-mediated signaling.
学会名: 第31回日本神経科学大会
場所: 東京 年月: 2008年7月9日

5. Nakazawa T., Kuriu T., Okabe S., Yamamoto T.
題名: Regulation of dendritic spine

morphology by an NMDA receptor-associated RhoGAP, p250GAP.

学会名: 37th ANNUAL MEETING Society for Neuroscience

場所: San Diego 年月: 2007年11月6日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗生 俊彦 (Kuriu Toshihiko)
徳島文理大学・香川薬学部・助教
研究者番号: 10401374

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小西 史朗 (Konishi Shiro)
徳島文理大学・香川薬学部・教授
研究者番号: 20014277